

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20620090153293

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

生物催化转化粗甘油产 1,3-丙二醇的研究

Production of 1,3-Propanediol from Raw Glycerol by
Biocatalytic Transformation

朱春杰

指导教师姓名: 方柏山 教授

专 业 名 称: 工 业 催 化

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
---------	---

Abstract.....	III
---------------	-----

第一章 文献综述	1
----------------	---

1.1 生物柴油与其副产物粗甘油	1
------------------------	---

1.1.1 生物柴油简介	1
--------------------	---

1.1.2 粗甘油的利用	2
--------------------	---

1.2 1,3-丙二醇简介	3
---------------------	---

1.2.1 1,3-丙二醇的性质与应用	3
---------------------------	---

1.2.2 1,3-丙二醇的合成方法.....	3
-------------------------	---

1.3 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的研究进展	5
-------------------------------	---

1.3.1 菌种	5
----------------	---

1.3.2 代谢途径和关键酶	6
----------------------	---

1.3.3 代谢产物对菌体生长代谢的影响	8
----------------------------	---

1.3.4 优良生产菌株的选育	10
-----------------------	----

1.3.5 发酵方式	11
------------------	----

1.3.6 培养基和培养条件的研究.....	13
------------------------	----

1.3.7 氧气对 1,3-丙二醇发酵的影响	14
------------------------------	----

1.3.8 共底物发酵.....	15
------------------	----

1.3.9 细胞固定化技术在 1,3-丙二醇发酵中的应用	16
------------------------------------	----

1.4 代谢工程在发酵甘油产 1,3-丙二醇中的应用	16
----------------------------------	----

1.4.1 在原始生产菌中过表达关键酶.....	16
--------------------------	----

1.4.2 阻断副产物代谢途径.....	18
----------------------	----

1.4.3 构建辅酶再生系统	18
----------------------	----

1.4.4 将 <i>dha</i> 操纵子克隆到非 1,3-丙二醇生产菌中	19
--	----

1.5 发酵甘油产 1,3-丙二醇的中试放大	19
------------------------------	----

1.6 发酵甘油产 1,3-丙二醇的动力学模型	20
-------------------------------	----

1.7 转化葡萄糖产 1,3-丙二醇的研究进展	22
-------------------------------	----

1.7.1 混合菌发酵.....	22
1.7.2 两步法发酵.....	22
1.7.3 工程菌一步发酵.....	22
1.8 以粗甘油为原料生产 1,3-丙二醇.....	24
1.8.1 发酵甘油生产 1,3-丙二醇的成本问题.....	24
1.8.2 发酵粗甘油生产 1,3-丙二醇的研究现状	24
1.9 本论文的立题依据和研究内容	26
1.9.1 立题依据	26
1.9.2 研究内容	26
第二章 粗甘油的预处理及其对发酵的影响	27
2.1 实验材料和方法	27
2.1.1 菌种	27
2.1.2 主要实验试剂	27
2.1.3 主要仪器与设备.....	28
2.1.4 培养基.....	29
2.1.5 实验方法	29
2.1.6 发酵液的分析方法	30
2.1.7 傅里叶变换红外光谱分析.....	30
2.1.8 气相色谱分析粗甘油中的脂肪酸	30
2.1.9 菌体能量代谢计算	31
2.2 结果与讨论.....	31
2.2.1 粗甘油的特性	31
2.2.2 粗甘油对菌体生长代谢的影响.....	31
2.2.3 预处理方法的选择	34
2.2.4 预处理条件的研究	35
2.2.5 预处理的粗甘油对菌体生长代谢的影响.....	38
2.2.6 活性炭的红外光谱分析	41
2.3 本章小结	41
第三章 培养基对菌体生长的影响	43
3.1 实验材料和方法	43
3.1.1 菌种	43

3.1.2	主要实验试剂	43
3.1.3	主要仪器与设备	43
3.1.4	培养基	43
3.1.5	实验方法	43
3.1.6	发酵液的分析方法	43
3.1.7	菌体能量代谢计算	43
3.2	结果与讨论	43
3.2.1	酵母粉对菌体生长代谢的影响	43
3.2.2	高酵母粉浓度下初始甘油浓度对菌体生长的影响	45
3.2.3	谷氨酸对菌体生长代谢的影响	48
3.2.4	脯氨酸对菌体生长代谢的影响	49
3.2.5	Mn ²⁺ 对菌体生长代谢的影响	51
3.3	本章小节	53
第四章	补料分批发酵条件的初步研究	54
4.1	实验材料和方法	54
4.1.1	菌种	54
4.1.2	主要实验试剂	54
4.1.3	主要仪器与设备	54
4.1.4	培养基	54
4.1.5	实验方法	54
4.1.6	发酵液的分析方法	54
4.1.7	菌体能量代谢计算	55
4.2	结果与讨论	55
4.2.1	酵母粉对补料分批发酵的影响	55
4.2.2	初始甘油浓度对补料分批发酵的影响	57
4.2.3	种子液的菌体浓度对补料分批发酵的影响	59
4.3	本章小结	61
第五章	提高单位菌体生产能力的研究	62
5.1	实验材料和方法	62
5.1.1	菌种	62
5.1.2	主要实验试剂	62

5.1.3 主要仪器与设备.....	62
5.1.4 培养基.....	62
5.1.5 实验方法	62
5.1.6 发酵液的分析方法	62
5.1.7 菌体能量代谢计算	62
5.2 结果与讨论.....	63
5.2.1 温度对分批发酵的影响	63
5.2.2 温度对补料分批发酵的影响	65
5.2.3 接种量对补料分批发酵的影响.....	66
5.2.4 变温控制对补料分批发酵的影响	68
5.2.4 降低磷酸盐浓度对菌体生长的影响.....	71
5.2.5 降低铵盐浓度对菌体生长的影响	73
5.3 本章小结	76
第六章 延长发酵周期的研究	77
6.1 实验材料和方法	77
6.1.1 菌种	77
6.1.2 主要实验试剂	77
6.1.3 主要仪器与设备.....	77
6.1.4 培养基.....	77
6.1.5 实验方法	77
6.1.6 发酵液的分析方法	77
6.1.7 菌体能量代谢计算	77
6.2 结果与讨论.....	78
6.2.1 pH 对菌体生长代谢的影响	78
6.2.2 pH 先高后低控制策略对补料分批发酵的影响	79
6.2.3 pH 先低后高控制策略对补料分批发酵的影响	80
6.2.4 无机铵盐对补料分批发酵的影响	84
6.3 本章小结	86
第七章 动力学模型及培养条件对动力学的影响	87
7.1 实验材料和方法	87
7.1.1 菌种	87

7.1.2 主要实验试剂	87
7.1.3 主要仪器与设备	87
7.1.4 培养基	87
7.1.5 实验方法	87
7.1.6 发酵液的分析方法	87
7.1.7 菌体能量代谢计算	87
7.2 结果与讨论	88
7.2.1 无机铵盐对菌体生长的影响	88
7.2.2 动力学模型的建立	89
7.2.3 初始甘油浓度对发酵动力学行为的影响	91
7.2.4 酵母粉对发酵动力学行为的影响	94
7.2.5 温度对发酵动力学行为的影响	97
7.2.6 pH 对发酵动力学行为的影响	100
7.3 本章小结	102
第八章 结论与展望	103
8.1 结论	103
8.2 特色与创新点	103
8.3 展望	105
参考文献	106
附录	106
致谢	128

Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Biodiesel and raw glycerol.....	1
1.1.1 Introduction of biodiesel	1
1.1.2 Utilization of raw glycerol.....	2
1.2 Introduction of 1,3-propanediol.....	3
1.2.1 Applications of 1,3-propanediol	3
1.2.2 Methods of 1,3-propanediol production.....	3
1.3 Advances in 1,3-propanediol fermentation from glycerol	5
1.3.1 Strains	5
1.3.2 Metabolic pathway and key enzymes	6
1.3.3 Effect of metabolites on fermentation.....	8
1.3.4 Selection of active producing strains	10
1.3.5 Fermentation patterns	11
1.3.6 Culture media and conditions.....	13
1.3.7 Effect of O ₂ on 1,3-propanediol fermentation	14
1.3.8 Co-fermentation	15
1.3.9 Application of immobilization in 1,3-propanediol fermentation	16
1.4 Application of metabolic engineering in 1,3-propanediol fermentation	16
1.4.1 Over-expression of key enzymes in 1,3-propanediol producing strains	16
1.4.2 Breaking pathway of byproducts	18
1.4.3 Constructing cofactor regeneration system.....	18
1.4.4 Expression of <i>dha</i> operon in other strains	19
1.5 Pilot-scale 1,3-propanediol fermentation from glycerol	19
1.6 Kinetic model of 1,3-propanediol fermentation from glycerol.....	20

1.7 Advances in 1,3-propanediol production from glucose.....	22
1.7.1 Mixed-culture fermentation	22
1.7.2 Two-stage fermentation.....	22
1.7.3 One-stage fermentation by Engineered strains	22
1.8 1,3-Propanediol fermentation from raw glycerol	24
1.8.1 Producton cost of 1,3-propanediol	24
1.8.2 Advances in 1,3-propanediol fermentation from raw glycerol.....	24
1.9 Topic basis and research content of this paper	26
1.9.1 Topic basis	26
1.9.2 Research content	26
Chapter 2 Pretreating raw glycerol and its effect on ferment.....	27
2.1 Materials and Methods	27
2.1.1 Microorganism	27
2.1.2 Experimental reagents.....	27
2.1.3 Experimental instruments	28
2.1.4 Culture media	29
2.1.5 Experimental methods	29
2.1.6 Analytical methods.....	30
2.1.7 Fourier transform infrared spectroscopy analysis	30
2.1.8 Analysis of free fatty acid by GC.....	30
2.1.9 ATP metabolism analysis	31
2.2 Results and Discussion	31
2.2.1 Characteristic of raw glycerol	31
2.2.2 Effect of raw glycerol on fermentation	31
2.2.3 Pretreatment method.....	34
2.2.4 Pretreatment conditions.....	35
2.2.5 Effect of pretreated raw glycerol on fermentation	38
2.2.6 FTIR spectroscopy analysis of activated carbon	41
2.3 Summary	41
Chapter 3 Effect of culture medium on microbial growth.....	43
3.1 Materials and Methods	43

3.1.1	Microorganism	43
3.1.2	Experimental reagents.....	43
3.1.3	Experimental instruments	43
3.1.4	Culture media	43
3.1.5	Experimental methods.....	43
3.1.6	Analytical methods.....	43
3.1.7	ATP metabolism analysis	43
3.2	Results and Discussion	43
3.2.1	Effect of yeast extract on microbial growth.....	43
3.2.2	Effect of initial glycerol concentration on microbial growth at high yeast extract concentration.....	45
3.2.3	Effect of glutamic acid on microbial growth	48
3.2.4	Effect of proline on microbial growth.....	49
3.2.5	Effect of Mn^{2+} on microbial growth	51
3.3	Summary	53
Chapter 4	Studies on culture conditions of fed-batch culture	54
4.1	Materials and Methods	54
4.1.1	Microorganism	54
4.1.2	Experimental reagents.....	54
4.1.3	Experimental instruments	54
4.1.4	Culture media	54
4.1.5	Experimental methods	54
4.1.6	Analytical methods.....	54
4.1.7	ATP metabolism analysis	55
4.2	Results and Discussion	55
4.2.1	Effect of yeast extract on fed-batch culture	55
4.2.2	Effect of initial glycerol concentration on fed-batch culture	57
4.2.3	Effect of inoculum concentration on fed-batch culture.....	59
4.3	Summary	61
Chapter 5	Enhancement of unit microbial production capacity.....	62
5.1	Materials and Methods	62

5.1.1	Microorganism	62
5.1.2	Experimental reagents.....	62
5.1.3	Experimental instruments	62
5.1.4	Culture media	62
5.1.5	Experimental methods	62
5.1.6	Analytical methods.....	62
5.1.7	ATP metabolism analysis	62
5.2	Results and Discussion	63
5.2.1	Effect of temperature on batch culture.....	63
5.2.2	Effect of temperature on fed-batch culture	65
5.2.3	Effect of inoculum rate on fed-batch culture	66
5.2.4	Effect of temperature-shift strategy on fed-batch culture.....	68
5.2.4	Effect of low phosphate concentration on microbial growth	71
5.2.5	Effect of low ammonium salt concentration on microbial growth.....	73
5.3	Summary	76
Chapter 6	Studies on fermentation period	77
6.1	Materials and Methods	77
6.1.1	Microorganism	77
6.1.2	Experimental reagents.....	77
6.1.3	Experimental instruments	77
6.1.4	Culture media	77
6.1.5	Experimental methods	77
6.1.6	Analytical methods.....	77
6.1.7	ATP metabolism analysis.....	77
6.2	Results and Discussion.....	78
6.2.1	Effect of pH on microbial growth	78
6.2.2	Effect of pH shift from high to low on fed-batch culture	79
6.2.3	Effect of pH shift from low to high on fed-batch culture	80
6.2.4	Effect of ammonium salt on fed-batch culture	84
6.3	Summary	86
Chapter 7	Kinetic model and Effect of culture conditions	87

7.1 Materials and Methods	87
7.1.1 Microorganism	87
7.1.2 Experimental reagents.....	87
7.1.3 Experimental instruments	87
7.1.4 Culture media	87
7.1.5 Experimental methods	87
7.1.6 Analytical methods.....	87
7.1.7 ATP metabolism analysis	87
7.2 Results and Discussion	88
7.2.1 Effect of ammonium salt on microbial growth.....	88
7.2.2 Developing kinetic model.....	89
7.2.3 Effect of initial glycerol concentration on kinetic behavior.....	91
7.2.4 Effect of yeast extract on kinetic behavior	94
7.2.5 Effect of temperature on kinetic behavior	97
7.2.6 Effect of pH on kinetic behavior.....	100
7.3 Summary	102
Chapter 8 Conclusions and Prospects.....	103
8.1 Conclusions	103
8.2 Innovations	103
8.3 Prospects.....	105
Reference.....	106
Appendix.....	106
Acknowledgments	128

摘 要

1,3-丙二醇 (1,3-PD) 是一种重要的化工原料, 具有广泛的应用领域。发酵法生产 1,3-PD 以利用可再生资源等优点日益受到重视。大部分研究以纯甘油为底物, 成本高, 如果以粗甘油为底物, 可大大降低生产成本。

本论文的研究目的是以粗甘油为底物, 以 *Clostridium butyricum* (丁酸梭状芽孢杆菌) 为生产菌株, 通过厌氧发酵生产 1,3-PD, 在粗甘油预处理、提高菌体浓度、提高单位菌体生产能力、延长发酵周期和建立动力学模型这几个方面进行了研究, 主要结果如下:

(1) 分批发酵结果表明粗甘油对发酵有明显的抑制作用。用粉状活性炭对粗甘油进行吸附预处理可显著降低抑制作用。通过均匀设计对预处理条件进行优化, 优化后活性炭用量明显降低, 而预处理粗甘油的发酵与纯甘油的发酵基本没有差别。红外光谱分析表明抑制性杂质很可能是苯环类化合物。

(2) 通过分批发酵考察酵母粉、谷氨酸、脯氨酸和 Mn^{2+} 对菌体生长的影响。提高酵母粉浓度能显著促进菌体生长。作为渗透压保护剂, 虽然能提高菌体的耐渗透压能力, 但谷氨酸不利于菌体的生长, 而脯氨酸对菌体生长的促进作用较低。 Mn^{2+} 对菌体生长没有促进作用。

(3) 试图通过提高补料分批发酵的菌体浓度来提高 1,3-PD 的产量。增加酵母粉的供给能显著促进菌体生长, 明显提高 1,3-PD 的产量, 但如果菌体过度过快生长, 即使菌体浓度很高, 1,3-PD 的产量却得不到提高。分析发现菌体过度过快生长使 ATP 代谢偏向菌体生长, 用于菌体维持能的 ATP 量减少, 导致单位菌体生产能力下降。初始甘油浓度对补料分批发酵有重要的影响, 过高或过低的初始甘油浓度或不利于菌体生长或不利于 1,3-PD 合成。提高种子液的菌体浓度能加速菌体生长, 但使 ATP 代谢偏向菌体生长, 不利于 1,3-PD 合成。以上结果表明, 菌体的 ATP 代谢会影响单位菌体合成 1,3-PD 的能力, 而菌体的生长速率会影响 ATP 代谢。

(4) 分批发酵结果表明, 降低培养温度能降低菌体生长速率, 使 ATP 代谢偏向菌体维持。在补料分批发酵中通过降低培养温度, 1,3-PD 的浓度由 49.3 g L^{-1} (37°C) 提高至 54.5 g L^{-1} (33°C)。降低接种量虽然能降低菌体生长速率, 使

ATP 代谢偏向菌体维持，但最终菌体浓度降低，1,3-PD 浓度没有得到有效提高。在不影响单位菌体生产能力的前提下，采用两阶段温度控制策略，1,3-PD 浓度进一步提高至 59.4 g L^{-1} 。试图通过降低磷酸盐和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度来降低菌体生长速率，但结果发现菌体生长速率不受影响。

(5) 试图通过调控 pH 和增加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的供给来延长发酵周期，但由于 pH 为 7.5 时不利于菌体的生长与生存，两阶段 pH 控制策略不能有效延长发酵周期，1,3-PD 的浓度只稍稍提高至 61.1 g L^{-1} ，而增加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的供给对发酵基本没有影响。

(6) 对分批发酵过程建立了动力学模型，并考察了初始甘油浓度、酵母粉浓度、培养温度和 pH 对发酵动力学行为的影响。结果发现培养条件对发酵动力学行为影响较大，有趣的是，提高酵母粉浓度使菌体最大比生长速率降低，但能使产物对菌体生长的抑制作用降低。某些培养条件下的发酵过程，虽然其发酵结果基本没有差别，但动力学行为差别较大。

关键词：1,3-丙二醇 粗甘油 菌体浓度 生产能力 动力学模型

Abstract

1,3-Propanediol (1,3-PD) is an important chemicals with wide range of applications. Microbial production of 1,3-PD has attracted wide attentions in that it uses renewable resources. Most studies were done using pure glycerol and its cost was high. The cost could be reduced if raw glycerol is used.

In this paper, raw glycerol was used for 1,3-PD fermentation by *Clostridium butyricum* under anaerobiosis. Investigations were focused on pretreating raw glycerol, increasing biomass, enhancing unit microbial production capacity, prolonging fermentation period, and developing kinetic model. Results are as follows:

(1) Batch cultures indicated that raw glycerol had inhibiting effect on fermentation. The inhibiting effect could be significantly relieved if raw glycerol was pretreated by adsorption using powdered activated carbon. The pretreatment conditions were optimized using Uniform Design. The activated carbon amount used in pretreatment was reduced after optimization while fermentation on pretreated raw glycerol was comparable with fermentation on pure glycerol. FTIR spectra indicated that the inhibiting impurities were probably aromatic compounds.

(2) Batch cultures indicated that microbial growth could be significantly stimulated by increasing yeast extract concentration. Glutaminic acid had negative effect on microbial growth while proline had little positive effect, although they could act as osmoprotectant. Mn^{2+} could not stimulate microbial growth.

(3) It was tried to increase the biomass of fed-batch culture to enhance 1,3-PD production. Microbial growth was significantly stimulated with 1,3-PD titer increased by increasing yeast extract supply. However, if microbial growth was excessive, 1,3-PD titer could not be increased in spite of higher biomass. ATP metabolism was prone to microbial growth if microbial growth was excessive, making ATP amount for microbial maintenance reduced. So unit microbial production capacity was low. Initial glycerol concentration had significant impact. It was not fit for microbial growth or

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.